

# 特殊水圏環境から単離した酵母および酵母様微細藻

浦野直人

東京海洋大学海洋環境学科

地球の水圏は未知微生物資源の宝庫と考えられる。水圏と陸圏を生物生存容積で比較すると約 50:1 となるうえ、水圏には膨大な人跡未踏地帯が存在するからだ。筆者らは 10 数年に渡り海洋深層・表層、河川、湖沼、排水路等由来の微生物に関する研究を行ってきたが、本報では水圏環境に適応した特異な酵母・酵母様微細藻の単離解析に関して報告する。

## 1. 耐熱性酵母および酵母様微細藻

伊豆蓮台寺温泉の排水路は、周年に渡り水温 35~40°C を維持し熱帯魚が生息している。当該水路から種々の耐熱性酵母を単離した。これらの酵母は *Pichia* や *Dekkera* 属であり、RND14 株は報告の無い 55°C でエタノール発酵能を保持していた。さらに RND16 株は酵母様微細藻 *Prototheca zopfii* であった。RND16 は強い n-アルカン資化能を保持し、*Prototheca* 属としては報告の無いエタノール発酵能も持っていた。

## 2. 耐酸性酵母

八ッ場ダム建設問題で揺れる草津吾妻川上流は、pH2~3 の強酸性河川であるが、中流での中和作業後は魚介類が生息する一般と同様の河川である。吾妻川一帯の微生物叢の調査を行ったところ、中和前の酸性水中には酵母のみが生息し、中和後の中性水は通常の微生物叢を呈していた。単離酵母約 800 株はほとんどが pH2.0 で増殖し、*Pichia stipitis* L35 株、*Candida sorbophila* Q5, Q27 株は報告の無い pH1.0 でも増殖した。

## 3. カロテノイド生産酵母

鯛や鮭等はアスタキサンチンを蓄積して体色や抗酸化性を維持するため、餌に安価なカロテノイド系色素を含有させることが重要となる。そこで水圏から赤色酵母を単離して色素生産能の高い酵母株を解析したところ、ほとんどが *Rhodotorula* 属であり、生産カロテノイドは  $\beta$ -カロテンが主体であった。特に生産能と増殖能が高かった *R. glutinis* Sag17 株の混合餌料を調製し、コイやティラピアに給餌したところ、飼育3カ月で体表にアスタキサンチンの蓄積が認められた。

## 4. エタノール高発酵酵母

水圏バイオマスの資源化計画が水産庁を中心に進行している。海藻を主体としたバイオマスのカスケード的有効利用を図り、最下流にエタノール・メタン・水素等のバイオ燃料生産を置く計画である。筆者は緑藻アオサと外来草ホテイアオイを原料としたバイオエタノール生産を試みている。さらに高エタノール発酵能を持つ酵母の広域スクリーニングを行っている。とりわけ海洋由来の C19 株、河川由来の TY-2 株は高い発酵能を保持しており、両株を分類同定したところ、いずれも *Saccharomyces cerevisiae* であった。C19 株は 15°C が最も発酵能が高く、低温高活性の酵母であることがわかった。

# 燃料用エタノール生産に向けた実証試験

阿部 透

サッポロビール（株）価値創造フロンティア研究所

演者らは、タイで取得された *Kluyveromyces marxianus* の高温エタノール発酵性株について、実用生産利用を目指した発酵試験を行ってきた。本試験開発においてサッポロビール（株）は、NEDO のバイオマスエネルギー先導技術研究開発事業で山口大学の共同研究先として、パイロットプラントスケールによる研究開発を担当している。本年は廃糖蜜を原料とするエタノール発酵の発酵速度や、温度をパラメータとした生産性、エタノール生産コストに係るデータなどを取得し、*Saccharomyces cerevisiae* に比較したコスト削減能力の評価を行っている。

今日の代表的な商用エタノール生産酵母である、*S. cerevisiae* は一般に 30℃～35℃ の温度領域でエタノール発酵が行われている。一方、*K. marxianus* によるエタノール発酵の上限温度は 45℃ 以上であり、49℃ の高温でも増殖能を有することが確認されている。この様に高温でエタノール発酵を行う利点は、発酵時の冷却負荷低減（特に、燃料エタノールの盛んな熱帯地域で有利）、生成エタノールの蒸留時の昇温負荷低減、冷却設備に代表される初期コストの低減、運転制御コストの低減など製造コストの低減が可能な事である。燃料用エタノールは代替エネルギーとしてのコスト競争力が求められているため、高温発酵性酵母を使うことで低コストでの製造を進展させることができると考えられる。

演者らはベンチスケールの結果を踏まえて、先ず 30L 容、続いて 300L 容発酵装置（サッポロビール社価値創造フロンティア研究所のパイロットプラント）に試験規模をスケールアップした。当該試験で、回分時間 24 時間で 8.5v/v% のエタノール生産を繰り返し継続できることを示した。

今日、燃料用エタノール生産は日本より東南アジア諸国の方が盛んである。よって、演者らの開発成果の応用先としてそれら国々を想定するべきと考えている。そこで、本プロセスが実用に耐えうることをこれら国々に体験してもらうために、現地の国での発酵試験を計画した。試験協力先として日本のアカデミアなどとも関係の深いタイ国チュラロンコン大学の協力を得て、同大学のパイロット設備にて発酵試験を実施した。本日は、その結果の一部をご紹介します。

研究開発は、NEDO バイオマスエネルギー先導技術研究開発「課題名；耐熱性酵母による低コスト化発酵技術の研究開発」にて、山口大学ならびに磐田化学工業株式会社と共同で行われた。

# Unfolded Protein Response とは何か？

木俣 行雄

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

特定のオルガネラの機能不全がストレスシグナルとして核に伝えられ、遺伝子発現が制御される・・・このような防衛応答の発見の先駆けとなったのが **Unfolded Protein Response (UPR)** です。小胞体は、細胞外や細胞表層に運ばれるタンパク質が折り畳まれる場であり、かつ、生体膜の産生工場です。「小胞体に折り畳み不全タンパク質が溜まると、小胞体内在性分子シャペロンの発現が誘導される」という現象が見つかって **UPR** と名付けられたのは、1980 年代終わりでした。1990 年代前半には **UPR** が起きない出芽酵母変異株が得られ、その原因遺伝子として **IRE1** が同定されたことから、**UPR** は小胞体から核へ向けたシグナル伝達として、確固たる認知を得るようになりました。

**Ire1p** は小胞体膜を貫通する I 型膜貫通タンパク質です。**Ire1p** の活性化が転写因子を生む過程は 1990 年代後半に明らかになりましたが、一方、**Ire1p** が小胞体の異常を感知して活性化する仕組みは長らく不明であり、私たちはその謎にアプローチしてきました。そしてまず、通常時には小胞体内在性分子シャペロン **BiP** が **Ire1p** と会合しており、その複合体の解離が **Ire1p** 活性化に必要であることを報告しました。さらに、**BiP** の解離を経て多量体化した **Ire1p** に折り畳み不全タンパク質が直接的に作用し、**Ire1p** は強い活性を発揮することを見いだしました。これらの事象により、「折り畳み不全タンパク質蓄積による **Ire1** の活性化」をうまく説明することが出来ます。

しかし一方で私たちは、折り畳み不全タンパク質に因らない **UPR** も提唱しています。**cDNA** マイクロアレイ解析では、**Ire1p** の活性化に伴い、**BiP** を含む分子シャペロン遺伝子だけでなく、膜脂質生合成酵素遺伝子なども幅広く発現誘導されることが分かりました。また、生体膜の恒常性を崩すようなストレスにより、折り畳み不全タンパク質を感知できない **Ire1p** 変異体も、野生型 **Ire1p** と同様に活性化します。すなわち、**Ire1p** が引き起こす **UPR** は、折りたたみ不全タンパク質の処理だけでなく、幅広く小胞体の機能不全に対応するためのシステムであると考えられるのです。

# ストレスに耐えて生きるには・・酵母に学ぶサバイバル戦略

西沢正文

慶應義塾大学医学部

出芽酵母は、環境変化に応じてその遺伝子発現プロファイルを変化させて新しい環境への適応を図るが、サイクリン依存性キナーゼである Pho85 キナーゼは栄養状態や塩濃度の変化に対するこのような細胞応答において重要な役割を果たしている。

リン酸飢餓状態になると、Pho81 が Pho85-Pho80 サイクリン複合体の活性を抑制する結果、転写因子 Pho4 が *PHO* 遺伝子の発現を活性化すると考えられている。リン酸飢餓シグナルの伝達にはイノシトールポリリン酸が重要な役割を果たしていることがわかってきた。われわれは  $IP_6$  キナーゼをコードする *KCS1* の ORF 中に Pho4 がリン酸濃度依存的に結合してアンチセンス (AS) RNA 合成を起こすことを見だし、この AS RNA が正常な Kcs1 発現量を低下させることでもう一つの  $IP_6$  キナーゼである Vip1 を介した  $IP_7$  合成量を増大させてリン酸シグナル伝達を増幅している可能性を示した。このことは、Pho4 が構造遺伝子の転写制御だけでなく、AS RNA によっても *PHO* system を制御していることを示している(1)。

Rim101 リプレッサーは酵母のアルカリ条件への適応に必要であるが、*pho85* 欠失株中では Rim101 によって抑制される遺伝子 (*NRG1*, *RIM8*) の発現が強く抑制され、逆に Nrg1 によって抑制される *ENA2* の発現が活性化されることを見いだした。このことは Pho85 が Rim101 の活性を抑える機能を果たしていることを示唆するが、Pho85 は *RIM101* の転写や Rim101 タンパク質の安定性に影響せず、また Rim101 の活性化に必要な Rim101 タンパク質のプロセッシングにも顕著な変動をもたらさなかった。しかし、Pho85 は Rim101 の核内への局在に関与することがわかり、それには Rim101 分子中の Ser/Thr キナーゼによるリン酸化部位が重要な役割を果たしていた。これらの結果は、Pho85 が Rim101 を核から排除することでそのリプレッサー活性を制御している可能性を示している(2)。これに加え、Pho4 もアルカリストレス応答に関与することがわかってきた。

このように Pho85 は細胞生育に良好な環境条件下ではストレス応答に関わる転写因子の機能を抑えていると考えられる。Pho4 や Rim101 がストレス条件下での G1 サイクリン発現を制御するという最近の知見を元に、Pho85 がどのように環境ストレスに応答して細胞増殖を制御しているかを考えてみたい。

(1) PLoS Biol. 6: e326, 2008.

(2) Eukaryot. Cell 9: 943, 2010.

# 麹菌の生存戦略 –Woronin body とオートファジー– 関連遺伝子の解析から見えてきたこと–

北本 勝ひこ

東京大学大学院農学生命科学研究科

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本酒、味噌、醤油の製造に使用される重要な微生物であり、日本醸造学会により 2006 年に、我が国を代表する微生物「国菌」として認定されている。古くから麹菌の育種や培養方法などの研究は多くなされてきたが、分子生物学的な解析は同じ真核微生物である酵母 (*S. cerevisiae*) に比べて大幅に遅れていた。しかし、2005 年に麹菌 (*A. oryzae*) ゲノム解読が完了し<sup>1)</sup>、この 5 年間で分子生物学的解析が飛躍的に進んでいる。演者らは、これまでほとんど研究がなされていなかった、多細胞からなり複雑な分化をとげる麹菌を理解することを目的として、細胞生物学的手法を駆使して研究を進めている。本講演では、最近までに明らかになった麹菌セルバイオロジーの成果<sup>2)</sup>のうち、Woronin body とオートファジー関連遺伝子の解析について紹介したい。

麹菌などの糸状菌は細長い菌糸細胞からなるが、その生育は先端生長により維持されている。従って、菌糸先端部位は細胞壁のリモデリングが活発に起こる場所であり、低浸透圧ショックなどにより先端細胞は容易に溶菌を起こす。2 番目の細胞とは隔壁で隔てられているが、その中心部には隔壁孔と呼ばれる穴があいており、隣接した細胞の細胞質はお互いに連絡している。そのため、先端細胞が溶菌したときに、溶菌の伝播が隣の細胞に及ぶことをさけるしくみとして、隔壁近くに Woronin body と呼ばれる糸状菌特異的なオルガネラが存在し<sup>3)</sup>、溶菌時には隔壁孔を塞ぐ働きをしている。また、隔壁孔は、常に開いているわけではなく、環境に応答して開閉していることもわかってきた。Woronin body を構成している AoHex1、およびストレスに応答して隔壁孔を開閉するのに働いている AoSO タンパク質<sup>4)</sup>について、最新の知見を紹介する。

吟醸酒用麹の製造には、精米歩合 50% という白米が使用されるので、ほとんどが澱粉というような栄養源として偏った培地(窒素源や無機イオンなどに関しては常に不足した条件)での生育が求められる。また、通常の培地でも、気中菌糸と呼ばれる培地から離れた菌糸では直接栄養を取り込むことができないので、糸状菌はつねに栄養源飢餓での生育をしているともいえる。オートファジー関連遺伝子 (*Aoatg8*, *Aoatg1*, *Aoatg4*, *Aoatg13*, *Aoatg15* など) の解析から、麹菌では分生子形成(種麹製造)、分生子発芽(製麹時)にはオートファジーが必須であることがわかってきた<sup>5,6)</sup>。また、栄養飢餓時には、麹菌はミトコンドリア、ペルオキシオーム、さらに核までもまるごと液胞に取り込むことを見いだした。核は遺伝情報の担い手として認識されているが、麹菌のような多核細胞生物では、いざというときの栄養源として利用されることを示唆しており、興味深いと考えている。

- 1) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, M. Machida *et al.*, *Nature*, 438, 1157-1161 (2005)
- 2) 糸状菌オルガネラの形態とその極性依存的な配置 –麹菌の小胞輸送経路の解析からみえてきたもの–, 正路、樋口、丸山、北本、蛋白質核酸酵素, 53, 753-759 (2008)
- 3) Disruption of the *Aopex11-1* gene involved in peroxisome proliferation leads to impaired Woronin body formation in *Aspergillus oryzae*, C. S. Escano *et al.*, *Eukaryot. Cell*, 8, 296-305 (2009)
- 4) AoSO protein accumulates at the septal pore in response to various stresses in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, J. Maruyama, C. S. Escano, K. Kitamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391, 868-873 (2010)
- 5) Functional analysis of the ATG8 homologue *Aoatg8*, and role of autophagy in differentiation and germination in *Aspergillus oryzae*, T. Kikuma *et al.*, *Eukaryot. Cell*, 5, 1328-1336 (2006)
- 6) Autophagy during conidiation and conidial germination in filamentous fungi, T. Kikuma *et al.*, *Autophagy*, 3, 128-129 (2007)